昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, May 2017, 60(5): 533-543 doi:10.16380/j.kcxb.2017.05.005

中华蜜蜂气味受体基因 *AcerOR*113 的克隆与时空表达分析

杜亚丽[1,#], 王树杰[1,#], 赵慧婷[2], 潘建芳[1], 杨 爽[1,3], 郭丽娜[1], 徐 凯[1], 姜玉锁[1,*]

(1. 山西农业大学动物科技学院, 山西太谷 030801; 2. 山西农业大学生命科学学院, 山西太谷 030801; 3. 云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所, 云南蒙自 661101)

摘要:【目的】鉴定中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 气味受体基因并分析其结构特征,明确其在外界蜜粉源充足和缺乏时期不同发育阶段各组织中的表达差异,以期为该基因的功能研究提供理论依据。【方法】利用 RT-PCR 技术从中华蜜蜂采集蜂触角中扩增获得气味受体基因的 cDNA 序列;利用生物信息学软件预测分析其编码蛋白的结构特性;采用 MEGA6.0 邻接法(neighbor-joining)构建系统进化树;利用实时荧光定量 PCR 技术分析该基因在不同蜜粉源条件下在中华蜜蜂不同日龄(1, 5, 10, 15, 20, 25 和 30 日龄)工蜂的不同组织(触角、头(去除触角)、胸(去除翅)、腹、足和翅)中的表达差异。【结果】从中华蜜蜂采集蜂触角中克隆获得了中华蜜蜂气味受体基因 *AcerOR*113 的 cDNA 序列(GenBank 登录号: KT252877.1)。该基因的开放阅读框(ORF)长 1 035 bp,编码 344 个氨基酸,成熟蛋白分子量为 40.13 kD,理论等电点(pI) 7.05,无信号肽,含有 6 个跨膜结构且 N 端位于胞内,在第 59-343 位氨基酸之间存在一个昆虫气味受体家族 7tm-6 superfamily 保守结构域。AcerOR113 与西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的 AmelOR113 亲缘关系最近,氨基酸序列一致性高达 94%。实时荧光定量 PCR 结果显示,无论外界环境中蜜粉源是否充足,*AcerOR*113 在不同日龄工蜂触角中的表达量均极显著高于其他组织($P<0.01$),腹部中的表达量最低;外界蜜粉源充足时各日龄工蜂触角中 *AcerOR*113 的表达量均极显著低于蜜粉源缺乏时相应日龄工蜂触角中的表达量($P<0.01$)。【结论】AcerOR113具有昆虫气味受体的典型特征,其基因特异性高表达于中华蜜蜂成虫触角中,且表达量在外界蜜粉源缺乏时期高于在蜜粉源充足时期,推测其主要与识别外界蜜粉源的花香气味有关。

关键词: 中华蜜蜂; 工蜂; 气味受体; 生物信息学分析; 时空表达; 蜜粉源

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2017)05-0533-11

Cloning and temporal-spatial expression profiling of the odorant receptor gene *AcerOR*113 in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*

DU Ya-Li[1,#], WANG Shu-Jie[1,#], ZHAO Hui-Ting[2], PAN Jian-Fang[1], YANG Shuang[1,3], GUO Li-Na[1], XU Kai[1], JIANG Yu-Suo[1,*] (1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China; 2. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China; 3. Institute of Sericulture and Apiculture, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mengzi, Yunnan 661101, China)

Abstract:【Aim】The objective of this study is to identify the odorant receptor gene from the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*, and to analyze its structure properties. Moreover, the expression profiles

基金项目: 国家自然科学基金项目(31502021, 31272513)

作者简介: 杜亚丽, 女, 1991 年 1 月生, 山西和顺人, 博士研究生, 研究方向为蜜蜂生物学, E-mail: duyali2000@yeah.net; 王树杰, 男, 1990 年 7 月生, 山东临沂人, 硕士研究生, 研究方向为动遗传育种与繁殖, E-mail: wsj19900520@163.com

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding author, E-mail: jiangys-001@163.com

收稿日期 Received: 2017-02-10; 接受日期 Accepted: 2017-04-10

of this gene in different tissues and different developmental stages of *A. c. cerana* under the plentiful or scarce nectar and pollen source conditions were explored, so as to provide a fundamental evidence for the further study on the physiological function of this gene. 【Methods】The cDNA sequence of the odorant receptor gene was amplified using RT-PCR from the antenna of *A. c. cerana* foragers, the deduced protein structure was predicted using different bioinformatics software, and the phylogenetic tree was constructed using neighbor-joining method of MEGA 6.0. The expression profiles of this gene in different tissues (antenna, head without antenna, thorax without wings, abdomen, legs and wings) of workers of different day-old (1, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 day-old) under different nectar and pollen source conditions were detected by quantitative real-time PCR. 【Results】The cDNA sequence of the odorant receptor gene *AcerOR*113 (GenBank accession no.: KT252877.1) was obtained from the antenna of *A. c. cerana* foragers. It contains a 1 035 bp open reading frame, encoding a putative protein of 344 amino acids with an estimated molecular weight of 40.13 kD and the theoretical pI of 7.05, no signal peptide, and with six transmembrane structure and N-terminal intracellularly located. A conserved 7tm-6 superfamily domain between 59 – 343 amino acid residues was identified. Amino acid sequence alignment and phylogenetic analysis showed that AcerOR113 has 94% amino acid sequence identity and the closest evolutionary relationship with AmelOR113 of *A. mellifera*. Real-time PCR data revealed that the expression level of *AcerOR*113 was extremely higher in the antenna than in other tissues ($P < 0.01$) of workers of different day-old, and the lowest in the abdomen. In the antenna, the expression level of *AcerOR*113 under the plentiful nectar and pollen source condition was extremely significantly lower than that under the scarce nectar and pollen source condition ($P < 0.01$). 【Conclusion】AcerOR113 possesses the typical characteristics of insect odorant receptor, and its gene is highly expressed in the antenna of *A. c. cerana* adults with significantly higher expression level under the scarce nectar and pollen source condition than under the plentiful nectar and pollen source condition, suggesting that *AcerOR*113 may be involved in the identification of floral scents of nectar and pollen in the environment.

Key words: *Apis cerana cerana*; worker; odorant receptor; bioinformatics analysis; temporal-spatial expression; pollen and nectar source

昆虫通过嗅觉来获悉食物、配偶乃至天敌所释放的挥发性物质信息,通过筛选鉴别这些化学信号发生交配、繁殖、觅食、群集、飞翔及趋避等行为(Sánchez *et al*., 2009; Forstner *et al*., 2009; 胡颖颖等, 2013)。研究表明,昆虫嗅觉识别过程涉及到多种蛋白,包括气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)、化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)、气味降解酶(odorant degrading enzymes, ODEs)、气味受体(odorant receptors, ORs)、离子型受体(ionotropic receptors, IRs)及嗅觉神经元膜蛋白(sensory neuron membrane proteins, SNMPs)等(Leal, 2013)。其中,ORs在气味分子引起嗅觉神经元产生神经冲动的过程中起着传递介质的作用,对其结构和功能的研究是深入认识昆虫识别化学信号机制的重要途径。

昆虫ORs一般由300~400个氨基酸组成,N-端没有信号肽,在嗅觉神经元(olfactory receptor neurons, ORNs)树突膜上特异性表达,并且含量非常低,含有7个α-螺旋跨膜结构域,但不属于G蛋白偶联受体;其N-末端在细胞膜内,C-末端在细胞膜外,呈反向拓扑结构(Benton, 2006; Benton *et al*., 2006)。昆虫ORs通常与共受体(odorant receptor co-receptor, Orco)以异源二聚体的形式组成一个配体门控离子通道,此结构可能与昆虫对外界气味物质及性信息素的识别和区分相关(Chang *et al*., 2015)。随着测序技术和生物信息学的深入发展,越来越多的昆虫ORs已被鉴定出来,且物种间数量差异较大,如已从果蝇 *Drosophila sechellia*(Gao and Chess, 1999)、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*(Hill *et al*., 2002)、西方蜜蜂 *Apis mellifera*(Robertson and Wanner, 2006)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*(Bohbot *et al*., 2007)、家蚕 *Bombyx mori*(Wanner *et al*., 2007a)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*(Engsontia *et al*., 2008)、豌豆蚜 *Acyrthosiphum pisim*(Smadja *et al*., 2009)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*(Liu *et al*., 2012)、小地老虎 *Agrotis ypsilon*(Gu *et al*., 2014)和小蜜蜂 *Apis florea*(Karpe *et al*., 2016)中分别鉴定出62, 79, 177, 131, 48, 341, 79, 47, 42和180个

ORs。Park 等(2015)完成了东方蜜蜂 *Apis cerana* 的全基因组测序，鉴定获得了 119 个 ORs。一般认为气味受体具有两个基本的生理功能，一是特异性识别并区分某些特殊的气味分子；二是将胞外的化学信号转换为电信号，导致 ORNs 产生动作电位，使昆虫作出相应的行为反应。根据氨基酸序列同源性和配基结合特性将气味受体分为普通气味受体(general olfactory receptor)和信息素受体(pheromone receptor)(Jones *et al*., 2005)。目前主要采用非洲爪蟾 *Xenopus laevis* 卵母细胞异源表达结合双电极电压钳技术测定某一气味受体对不同气味物质的电生理反应。采用此方法，刘一鹏等(2015)研究表明，小菜蛾 *Plutella xylostella* 普通气味受体 PxylOR9 只对植物挥发物 β-紫罗兰酮有反应；Chang 等(2015)证实二化螟 *Chilo suppressalis* 性信息素受体 CsupPR4 能够特异性识别其信息素的主要成分 *Z*9-16-Ald；张志翔等(2016)发现绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 气味受体 AlucOR40 只特异性识别反-2-己烯醇。

蜜蜂的气味受体基因最早由 Krieger 等(2003)利用 Or83b 家族的保守性扩增获得，命名为 *AmelR*2，原位杂交实验结果显示其在触角的毛形感器和板形感器中的感受神经元中表达。随后，Robertson 和 Wanner(2006)在西方蜜蜂 *A. mellifera* 全基因组测序完成的基础上，利用生物信息学的方法，筛选获得了 177 个气味受体基因，其中包含 7 个假基因。研究表明，意大利蜜蜂 *A. m. ligustica* 气味受体 AmelOR11 能特异性识别 9-ODA(Wanner *et al*., 2007b)，AmelOR151 可与芳樟醇结合(Claudianos *et al*., 2014)。赵慧婷(2013)和赵慧婷等(2012, 2015)从中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 触角中克隆获得了 3 个气味受体基因，其中 *AcerOR*2(也称为 *AcerOrco*)属于 *Or83b* 家族，其在中华蜜蜂触角的板形感器和毛形感器中偏雄性表达，可能与中华蜜蜂触角感器发育和嗅觉功能密切相关。

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 是我国独有的蜜蜂当家品种，因其较西方蜜蜂飞行迅捷、嗅觉灵敏、抗逆性强和善于采集零星蜜粉源等优点而深受养蜂者的喜爱，尤其是在山林地区(杨冠煌, 2009)。目前国内对于中华蜜蜂气味受体的研究主要集中在共受体上，但有关普通气味受体的表达与功能研究仍处于起步阶段。课题组前期在对中华蜜蜂不同发育阶段(1, 10, 18 和 25 日龄)触角转录组测序数据分析中，筛选获得了多个差异表达基因。本研究对其中的一个显著上调表达的基因进行了克隆、测序和分析，将其命名为 *AcerOR*113，并通过实时荧光定量 PCR 技术对其在外界蜜粉源充足和缺乏时期不同日龄和不同组织中的表达差异进行了比较分析，以期为该基因的功能研究提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试样本的采集

本研究所用中华蜜蜂 *A. c. cerana* 饲养于山西农业大学动物科技学院校内中蜂实验场，分别在 2015 年外界蜜粉源充足时期(5－6 月)和外界蜜粉源缺乏时期(7－8 月)进行样本的标记及采集工作。

采样方法：选取健康无病、群势较强且相当的中蜂 3 群，分别加入一张新巢脾，待蜂王产卵后用框式隔王板隔开。20 d 之后提脾观察，发现有新蜂出房时将成熟封盖子脾取出，置于人工气候培养箱(温度为 34℃ ±0.4℃，相对湿度为 75% ～80%)中，次日待大量新蜂羽化出房后，用无毒无味的油漆在背部进行标记，标记完毕后再将巢脾及标记好的工蜂放回原蜂群中。刚羽化出房的工蜂标记为 1 日龄，以后每 5 d 取一次，每次每群各取 100 头，直至看不到被标记的工蜂，取样结束。将采样得到的中华蜜蜂立即带回实验室，低温麻醉之后用眼科镊将其触角、头(去除触角)、胸(去除翅)、腹、足、翅分开，并迅速投入盛有液氮的研钵中，研磨至粉末状倒入装有 1 mL Trizol(4℃)的 EP 管中，－80℃保存至 RNA 提取。

1.2　主要试剂和仪器

总 RNA 提取试剂 Trizol(Invitrogen, USA)购自北京索莱宝科技有限公司；cDNA 第 1 链合成试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)、荧光定量试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ(Tli RNaseH Plus)、DNA Marker DL1000 和固相清除剂均购自宝生物工程(大连)有限公司；PCR 反应试剂盒 2 × Es Taq MasterMix 购自北京康为世纪生物科技有限公司；无水乙醇、异丙醇、氯仿等分析纯试剂购自天津科密欧化学试剂有限公司。

5810R 高速冷冻离心机(Eppendorf)，AB-9902 型触摸式 PCR 仪(ABI)，7500 型实时荧光定量仪(ABI)，Universal Hood Ⅱ 紫外凝胶成像仪(Bio-Rad)，ND-1000 核酸蛋白浓度测定仪(Nanodrop)和 DYCP-31DN 型 DNA 电泳仪。

1.3 RNA 提取和 cDNA 第 1 链合成

将 1.1 节中华蜜蜂研磨样品从 -80℃冰箱中取出，按照 Trizol 试剂说明书提取不同日龄工蜂各组织总 RNA。经纯度和浓度检测后，根据 PrimeScript^{TM} RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒说明书反转录合成 cDNA 模板，直接进行后续实验或 -20℃保存备用。

1.4 引物设计

根据中华蜜蜂触角转录组数据得到的 Unigene 序列，采用 Primer 3.0 Plus 在线软件设计引物，用于 PCR 扩增获得目的基因 cDNA 序列，并利用 Primer Premier 5.0 软件在开放阅读框(ORF)区域设计特异性引物用于荧光定量 PCR。选用中华蜜蜂的 Arp1(actin releated protein 1)基因(GenBank 登录号：HM640276.1)作为内参基因，引物信息详见表 1。所需引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

基因名称 Gene name	引物序列(5′-3′) Primer sequences	退火温度(℃) Annealing temperature	产物长度(bp) Product size	引物用途 Use of primers
*OR*113	F：GCATTTATCTTCGCCTTGGT R：TGAACAGAGACTTGACCTTCGT	56	388	基因克隆 Gene cloning
	F：GGCTTCTTTGTCTTTGTCTT R：CGTTCGTGTCCTTGAATAG	54	800	
	F：CCGAGGAAAAGATAAAAGAG R：TAAACGAGGTGGAGTTAGA	60	385	
*OR*113	F：GGCTTTTGCATTTGCGTTGG R：CAATGCCAGTTTCTGTGGCG	60	117	实时荧光定量 PCR Quantitative real-time PCR
*Arp*1	F：ACTACGGCCGAACGTGAAAT R：GGAAAAGAGCCTCGGGACAA		185	

1.5 基因克隆与测序

以合成的中华蜜蜂采集蜂触角 cDNA 第 1 链为模板，用表 1 中的 3 对引物对相应的基因序列进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 μL)：2 × Es Taq MasterMix 10 μL，cDNA 2 μL，正向和反向引物(10 μmol/L)各 1 μL，RNase-Free Water 6 μL。反应条件：94℃预变性 4 min；94℃ 30 s，退火(退火温度见表 1)40 s，72℃延伸 1 min，循环 35 次；72℃终延伸 8 min，4℃保存。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测(120 V, 30 min)后，在凝胶成像系统中检测并拍照。割取含有目的 DNA 条带的凝胶置于干净的 1.5 mL 离心管中，送北京华大基因科技有限公司进行双向测序。

1.6 生物信息学分析

采用 DNAStar 软件中的 SeqMan 工具拼接测序结果，利用在线软件 ORF Finder(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html)查找序列的开放阅读框，使用 DNAMAN 软件预测其编码的氨基酸序列，在 NCBI 中用 BlastP(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)工具进行氨基酸序列同源性分析。运用在线工具 NCBI Conserved Domains(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)分析保守结构域；ProtParam(http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam)预测蛋白的分子量、等电点等理化性质；TMHMM-2.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)分析跨膜结构；SignalP 4.1(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)预测信号肽序列；NetOGlyc4.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/)、NetNGlyc1.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)和 NetPhos 2.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/)分别预测其 O-糖基化、N-糖基化和磷酸化位点。将编码的氨基酸序列导入 GOR 软件中进行蛋白二级结构的预测。利用 ClusalX 软件进行氨基酸的多序列比对，采用 MEGA6.0 软件中的邻接法(Neighbor-Joining)(Bootrap 为 1 000 次)构建系统发育树。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测

将 1.3 节反转录合成的工蜂不同日龄各组织 cDNA 模板进行 4 倍稀释，然后根据 TaKaRa 的 SYBR® Premix Ex Taq^{TM} Ⅱ(Tli RNaseH Plus)试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR。优化的 Real-time PCR 反应体系：cDNA 模板 2 μL，SYBR® Premix Ex Taq^{TM} Ⅱ(2 ×)10 μL，上、下游引物(10 μmol/L)分别为 0.8 μL，ROX Reference Dye Ⅱ(50 ×)0.4 μL，

ddH_2O 6 μL，总反应体系为 20 μL。反应程序：95℃预变性 30 s；95℃变性 5 s，60℃退火及延伸 34 s，45 个循环。每个样本进行 3 次技术重复，每次试验都选用同一模板作为外参。

1.8　数据统计与分析

实时荧光定量 PCR 结果应用 7500 Real-time PCR System 软件进行分析处理。根据标准曲线及荧光曲线的 Ct 值，采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行相对定量数据分析。采用 SPSS18.0 软件中的 ANOVA 法进行单因素方差分析，并选用 Duncan 氏法进行显著性差异分析。所得结果均以平均数 ± 标准误（*SE*）表示，并利用 GraphPad Prism 5.2 软件进行图形分析。

2　结果

2.1　中华蜜蜂 *AcerOR*113 基因的扩增与测序

将各对引物扩增的特异性产物经测序后使用 SeqMan 工具进行拼接，成功获得了中华蜜蜂气味受体基因完整 ORF 序列（图 1），序列长度为1 035 bp，编码 344 个氨基酸。将其氨基酸序列在 NCBI 中进行 BlastP 比对，结果显示与西方蜜蜂 AmelOR113 氨基酸序列一致性为 94%，确定测序得到的序列为中华蜜蜂 *AcerOR*113 基因 cDNA 序列。该基因已提交至 GenBank 数据库，登录号为 KT252877.1。

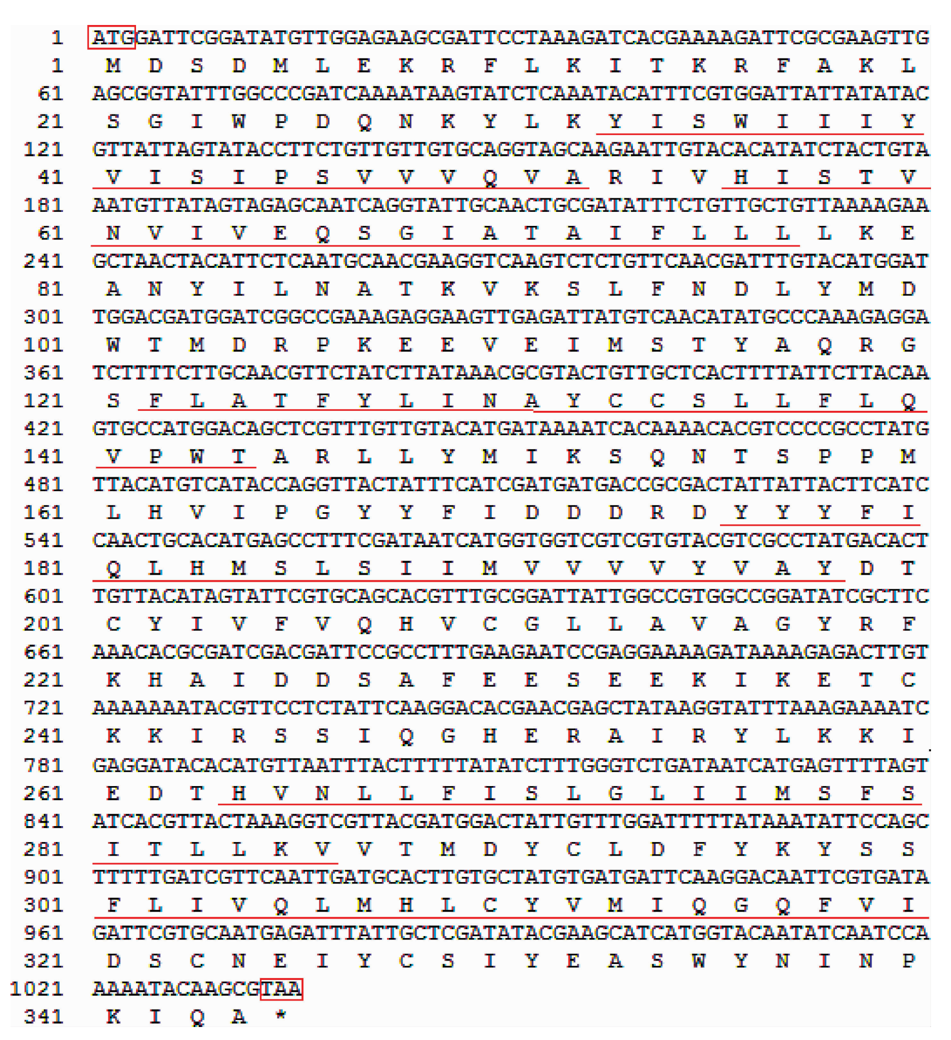


图 1　中华蜜蜂 *AcerOR*113 cDNA 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *AcerOR*113 cDNA of *Apis cerana cerana*

起始密码子和终止密码子用红色方框标识，6 个跨膜区序列用红色下划线标注。The start and stop codons are indicated by red boxes; the six transmembrane domains are underlined in red.

2.2　AcerOR113 的理化性质及结构分析

AcerOR113 蛋白分子式为 $C_{1859}H_{2873}N_{443}O_{500}S_{22}$，预测蛋白分子量为 40.13 kD，理论等电点（pI）7.05，偏碱性。在 AcerOR113 氨基酸组成中，异亮

氨酸(Ile)所占比例最高,达 11.4%;色氨酸(Trp)所占比例最低,为 1.5%;带负电荷的氨基酸残基(Asp + Glu)总数为 32,带正电荷的氨基酸残基(Arg + Lys)总数为 32,表明该蛋白不带电荷。AcerOR113 的总平均亲水性系数为 0.334,脂溶指数为 112.73,不稳定系数为 35.87,说明该蛋白是一种稳定的疏水性蛋白。

NCBI 在线结构域分析结果表明,*AcerOR*113 编码产物的第 59 – 343 位氨基酸之间存在一个昆虫气味受体家族的保守结构区域 7tm-6 superfamily (E-value 为 1.25e-12)。AcerOR113 蛋白无信号肽序列,具有 6 个跨膜结构,分别位于第 33 – 52, 56 – 78, 122 – 144, 176 – 198, 264 – 286 和 301 – 320 位氨基酸之间,且 N 端位于胞内(图 2)。AcerOR113 氨基酸序列中未检测到 O-糖基化位点,可能存在一个 N-糖基化位点,为第 86 位的天冬酰胺(Asn);含有 15 个潜在的磷酸化位点,包括 6 个丝氨酸($Ser^{21, 92, 114, 157, 232, 246}$)、2 个苏氨酸($Thr^{200, 263}$)和 7 个酪氨酸($Tyr^{83, 98, 116, 177, 327, 331, 336}$)。蛋白二级结构预测结果表明,α-螺旋(helix)、β 折叠(strand)和卷曲环(coil loop)所占比例分别为 27.03%, 31.10% 和 41.86%。

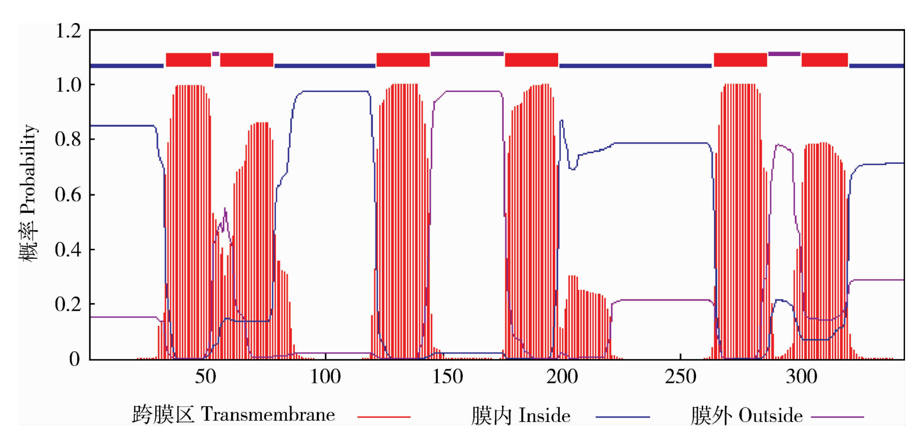


图 2 中华蜜蜂 AcerOR113 蛋白跨膜结构的预测

Fig. 2 Prediction of transmembrane structure of AcerOR113 of *Apis cerana cerana*

2.3 AcerOR113 系统进化分析

将获得的氨基酸序列在 NCBI 数据库中进行 BlastP 分析,找到与 AcerOR113 具有同源性的昆虫 ORs 氨基酸序列,主要包括膜翅目的蜜蜂科(Apidae)和蚁科(Formicidae),而在其他目类的昆虫中几乎找不到相似序列。与 AcerOR113 序列一致性最高的是西方蜜蜂 AmelOR113,达 94%;其次是小蜜蜂 AfloOR13a-like,序列一致性为 86%;与其他昆虫 ORs 序列一致性在 30% ~80% 之间。使用 MEGA6.0 软件的邻连法构建系统发育树(图 3)可以看出,所有选用的膜翅目昆虫 ORs 形成两个大的分支:同为蜜蜂科的中华蜜蜂 AcerOR113 与西方蜜蜂 AmelOR113 和 AmelOR109, 小蜜蜂 AfloOR13a-like 和 AfloOR22a-like 与大蜜蜂 *Apis dorsata* AdorOR1-like 和兰花蜂 *Eufriesea mexicana* EmexOR13a-like, 熊蜂属 *Bombus* 的 BterOR13a-like 和 BimpOR33b-like 与迴条蜂 *Habropoda laboriosa* HlabOR71a 聚为一个分支,其中 AcerOR113 与 AmelOR113 亲缘关系最近;同为蚁科的法老蚁 *Monomorium pharaonis* MphaOR22c-like, 埃氏扁胸切叶蚁 *Vollenhovia emeryi* VemeOR13a-like 和 VemeOR22c-like, 小火蚁 *Wasmannia auropunctata* WaurOR13a-like, 毕氏粗角猛蚁 *Cerapachys biroi* CbirOR13a-like 以及红色收获蚁 *Pogonomyrmex barbatus* PbarOR94b-like 聚为另一大分支。

2.4 *AcerOR*113 mRNA 时空表达分析

以蜜粉源充足时期 10 日龄工蜂头部中的 *AcerOR*113 mRNA 表达量为相对定量基准,通过实时荧光定量 PCR 技术分析不同蜜粉源环境条件下,在 1, 5, 10, 15, 20, 25 和 30 日龄工蜂不同组织中 *AcerOR*113 mRNA 的表达水平,结果如图 4 和图 5 所示,无论外界蜜粉源是否充足,*AcerOR*113 在各日龄工蜂触角中的表达量最高,均极显著地高于其他组织($P < 0.01$);在头、胸、腹、足和翅中均呈低丰度表达,且腹部中的表达量最低,仅为相应日龄工蜂触角中表达量的 1/6 101 ~1/140。触角作为昆虫最重要的嗅觉器官,在嗅觉识别过程中起着主要的作用。综合本研究所得结果,我们仅对触角中 *AcerOR*113 mRNA 的发育性表达进行了比较分析。

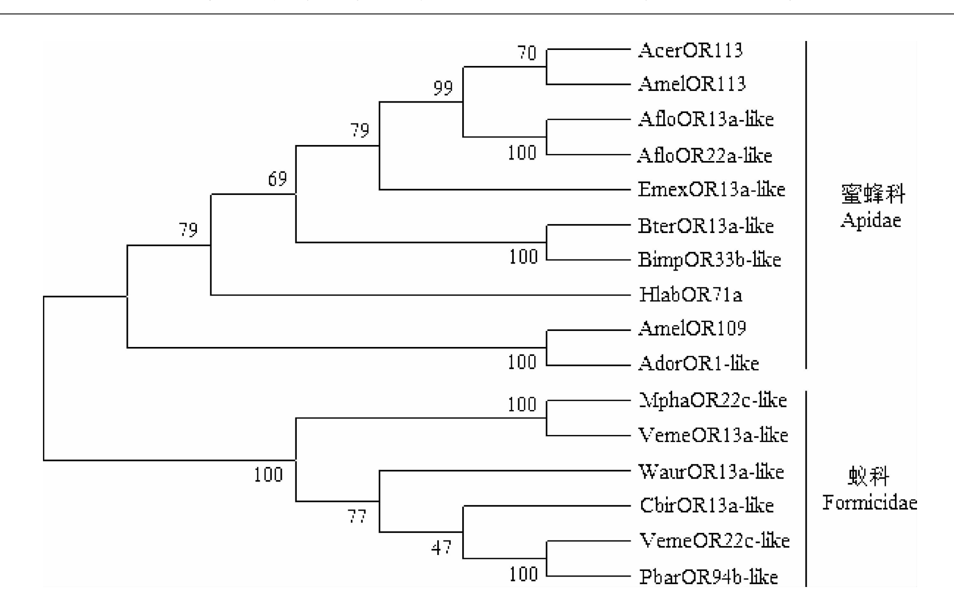


图 3　基于氨基酸序列构建的膜翅目昆虫 ORs 的系统进化树(邻接法)

Fig. 3　Phylogenetic tree of ORs from Hymenoptera insects reconstructed based on amino acid sequences with neighbor-joining method

蛋白质来源及 GenBank 登录号或参考文献 The origin species of proteins and their GenBank accession numbers or references：AcerOR113：中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*，ALP75639.1；AmelOR113：西方蜜蜂 *Apis mellifera*（Robertson and Wanner，2006）；AmelOR109：西方蜜蜂 *Apis mellifera*，NP_001229917.1；AfloOR13a-like：小蜜蜂 *Apis florea*，XP_012348754.1；AfloOR22a-like：小蜜蜂 *Apis florea*，XP_012348755.1；EmexOR13a-like：兰花蜂 *Eufriesea mexicana*，XP_017753435.1；BterOR13a-like：地熊蜂 *Bombus terrestris*，XP_012170045.1；BimpOR33b-like：熊蜂 *Bombus impatiens*，XP_012247254.1；HlabOR71a：迥条蜂 *Habropoda laboriosa*，KOC58663.1；AdorOR1-like：大蜜蜂 *Apis dorsata*，XP_006608961.1；MphaOR22c-like：法老蚁 *Monomorium pharaonis*，XP_012526541.1；VemeOR13a-like：埃氏扁胸切叶蚁 *Vollenhovia emeryi*，XP_011869872.1；VemeOR22c-like：埃氏扁胸切叶蚁 *Vollenhovia emeryi*，XP_011865384.1；WaurOR13a-like：小火蚁 *Wasmannia auropunctata*，XP_011686089.1；CbirOR13a-like：毕氏粗角猛蚁 *Cerapachys biroi*，XP_011334659.1；PbarOR94b-like：红色收获蚁 *Pogonomyrmex barbatus*，XP_011643586.1. 每一枝节点上的 Bootstrap 数值表示 1 000 次重复计算的百分比值。Bootstrap values（%）are based on 1 000 replicates.

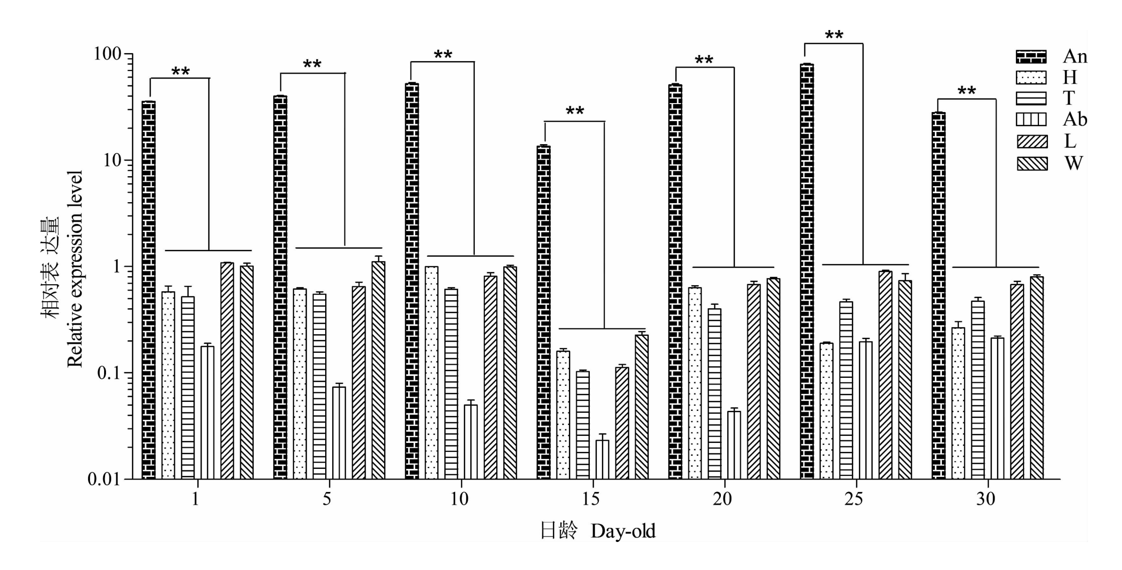


图 4　外界蜜粉源充足时 *AcerOR*113 在中华蜜蜂不同日龄工蜂和不同组织中的相对表达量

Fig. 4　Relative expression levels of *AcerOR*113 in different tissues of *Apis cerana cerana* workers of different day-old under the plentiful nectar and pollen source condition

An：触角 Antenna；H：头(去除触角) Head without antenna；T：胸(去除翅) Thorax without wings；Ab：腹 Abdomen；L：足 Legs；W：翅 Wings. 基因表达量以 10 日龄工蜂头部中的表达量为基础；图中数据为平均值 ± 标准误；柱上双星号表示同一日龄工蜂不同组织间 *AcerOR*113 表达量差异极显著($P<0.01$)(Duncan 氏多重比较法)。图 5 同。The expression level of gene was normalized to that in the head of workers of 10-day-old. Data are mean ± *SE*. Double asterisks above the bar indicate extremely significant difference in the expression quantity of *AcerOR*113 in different tissues of workers of the same day-old ($P<0.01$)(Duncan's multiple range test). The same for Fig. 5.

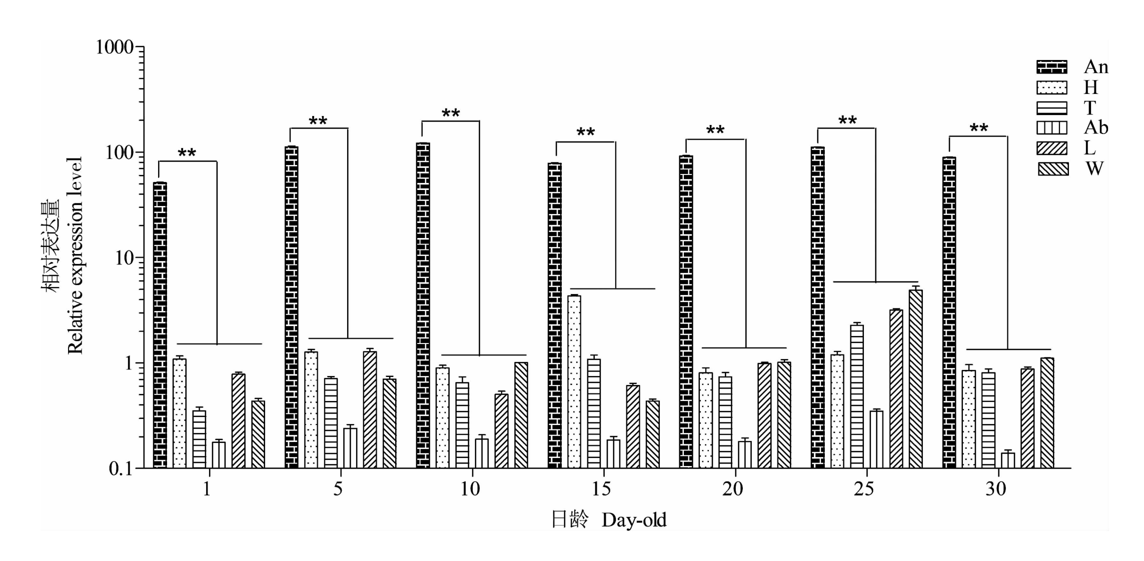


图 5 外界蜜粉源缺乏时 *AcerOR*113 在中华蜜蜂不同日龄工蜂和不同组织中的相对表达量

Fig. 5 Relative expression levels of *AcerOR*113 in different tissues of *Apis cerana cerana* workers of different day-old under the scarce nectar and pollen source condition

从 *AcerOR*113 在中华蜜蜂不同日龄工蜂触角中的表达模式(图 6)来看,*AcerOR*113 的表达量随日龄的变化而变化。在外界蜜粉源充足时,1 日龄工蜂触角中 *AcerOR*113 的表达量较低,之后缓慢增加,15 日龄后突然下降,25 日龄时又达到最高,极显著高于其他日龄($P<0.01$);随后又呈逐渐下降趋势。外界蜜粉源缺乏时表达趋势与之基本一致,且 10 日龄工蜂触角中表达量达到最高,极显著高于其他日龄($P<0.01$);1 日龄中表达量最低。总体来看,外界蜜粉源充足时各日龄工蜂触角中 *AcerOR*113 表达量均极显著低于蜜粉源缺乏时相应日龄中的表达量($P<0.01$)。

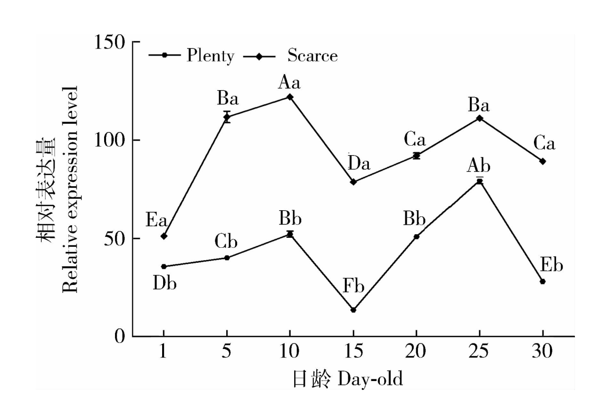


图 6 *AcerOR*113 mRNA 在中华蜜蜂不同日龄工蜂触角中的相对表达量

Fig. 6 Relative expression levels of *AcerOR*113 mRNA in the antenna of *Apis cerana cerana* workers of different day-old

Plenty: 蜜粉源充足 Plentiful nectar and pollen source; Scarce: 蜜粉源缺乏 Scarce nectar and pollen source. 大写字母表示相同蜜粉源条件下不同日龄工蜂间 *AcerOR*113 mRNA 在触角中相对表达量差异极显著($P<0.01$)(Duncan 氏多重比较法);小写字母表示同一日龄工蜂不同蜜粉源环境间 *AcerOR*113 mRNA 在触角中的相对表达量差异极显著($P<0.01$)(Duncan 氏多重比较法)。Uppercase letters indicate extremely significant difference in the relative expression levels of *AcerOR*113 mRNA in the antenna of workers of different day-old under the same source of nectar and pollen ($P<0.01$)(Duncan's multiple range test), while lowercase letters indicate extremely significant difference in the relative expression levels of *AcerOR*113 mRNA in the antenna of workers of the same day-old among different source of nectar and pollen ($P<0.01$)(Duncan's multiple range test).

3 讨论

气味受体在昆虫嗅觉识别的生理过程中发挥着重要的作用。一般认为,昆虫气味受体是位于嗅觉神经元树突上的膜蛋白,典型结构特征是具有 7 个跨膜结构域并且 N 末端位于细胞膜内。本研究氨基酸序列分析结果显示,中华蜜蜂 AcerOR113 只含有 6 个跨膜结构,这与棉铃虫 HarmOR9(刘宁灿等, 2014)、小菜蛾 PxylOR18(孔畅仪等, 2014)、中华蜜蜂 AcerOR1 和 AcerOR3(Zhao *et al.*, 2014)的预测结果相一致,也与 Bengtsson 等(2012)预测发现其他昆虫的传统气味受体可能具有 4 ~ 8 个跨膜结构相一致,因此,推断 AcerOR113 符合昆虫气味受体的结构特征。通过氨基酸序列比对发现,AcerOR113 与其他昆虫的气味受体,特别是膜翅目蜜蜂科昆虫的气味受体有较高的氨基酸序列一致性,尤其是与西方蜜蜂 AmelOR113 的一致性达到 94%,推测它们是直系同源基因。

mRNA 翻译得到的蛋白质多肽链多数是没有生物活性的初级产物，需要进行蛋白的折叠和修饰等加工后才能转变成有活性的终产物。磷酸化发生在翻译后，由各种蛋白质激酶催化，将磷酸基团连接于丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的羟基上，使蛋白质的空间构象发生改变，增强了蛋白质的生物活性，这与多种生物学过程如信号转导、转录调控、细胞分裂和凋亡等密切相关（梁前进等，2012）。本研究预测得到 AcerOR113 含有 15 个潜在的磷酸化位点，这些位点的存在可能与嗅觉系统中的电化学信号转导过程相关。

触角是昆虫嗅觉感器的主要部位（赵红霞等，2015）。绝大多数昆虫 ORs 在触角中高表达，在其他组织中微量表达甚至忽略不计。本研究中 *AcerOR*113 在中华蜜蜂不同发育阶段的触角中表达量就极显著高于其他组织（$P < 0.01$），这与杨珊珊（2015）研究的 *AcerOR*1 表达模式基本一致。蜜蜂作为一种高度的社会性昆虫，其行为与其发育阶段和外界环境的变化密切相关，一般来说，工蜂在 18 日龄以前都在巢内承担泌蜡造脾、清理蜂箱、饲喂幼虫和蜂王、调制蜂粮等工作，18 日龄以后，工蜂会逐渐转向巢外进行采集花蜜、花粉、树胶、水及巢门守卫等工作。但具体分工依蜂巢内外环境，进行适当的调整（匡邦瑜和匡海鸥，2002；Graham，2015）。本研究结果显示，*AcerOR*113 在 15 日龄工蜂触角中的表达量下降，可能是 15 日龄为中华蜜蜂由内勤蜂转变为采集蜂的过渡阶段，详细原因还有待进一步研究。另有研究发现，采集蜂工作 10 日龄以上，死亡率达到 20%，工作 18 日龄以上，死亡率高达 100%（Dukas *et al.*，2008）；工作 15 日龄以上的采集蜂，其空间记忆和联想学习能力明显衰退，同时伴随着脑部的蛋白质和脂类的氧化损伤、突触和生长相关蛋白的神经元减退的问题（Scheiner and Amdam，2009；Münch *et al.*，2010），这与本研究中所显示的 30 日龄工蜂触角表达量的下降密切相关。

蜂群对于蜜粉的采集是以可识别的化学信号为基础，通过气味受体的接受以及体内对其信息进行加工处理后的一种行为。蜂群通过对花蜜和花粉的需求量来驱动工蜂出巢采集花粉的积极性，并直接决定了蜂巢内蜜粉的储量（陈璇和胡福良，2009）。Fewell 和 Winston（1992）设置了 2 组实验蜂群，一组蜂群处于花粉充足的状态，另外一组处于花粉缺少的状态，然后观察它们采粉积极性的差异。结果显示，相对于花粉充足的蜂群来说，在花粉缺少状态下的蜂群采粉效率提高了 54%。还有研究表明，蜂群内蜜粉的不足以及外界环境蜜粉源的缺乏，又或者幼虫数量增多等原因，都会导致工蜂采集积极性的加强，反之亦然（Dreller and Tarpy，2000；Pankiw，2005）。本研究中，外界蜜粉源缺乏时各日龄触角中 *AcerOR*113 的表达量均极显著高于蜜粉源充足时相应日龄时的表达量（$P < 0.01$），推测该基因主要与工蜂识别外界蜜粉源的花香气味有关，有助于更好地发现和利用零星的蜜粉源。

蜜蜂需要感知各种花香气味并通过多种信息素来协调蜂群个体的行为，气味受体基因作为媒介在化学信号的识别和转导过程中发挥了重要作用。目前对于中华蜜蜂 *AcerOR*113 的研究虽不能完全阐明其在蜜粉充足和缺乏时的具体功能，但已经明确了其表达规律，为该蛋白的进一步功能研究奠定了基础，同时也为蜜蜂其他气味受体结构和功能的研究提供理论参考。

参考文献（References）

Bengtsson JM, Trona F, Montagné N, Anfora G, Ignell R, Witzgall P, Jacquin-Joly E, 2012. Putative chemosensory receptors of the codling moth, *Cydia pomonella*, identified by antennal transcriptome analysis. *PLoS ONE*, 7(2): e31620.

Benton R, 2006. On the ORigin of smell: odorant receptors in insects. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63(14): 1579–1585.

Benton R, Sachse S, Michnick SW, Vosshall LB, 2006. Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors *in vivo*. *PLoS Biol.*, 4(2): e20.

Bohbot J, Pitts RJ, Kwon HW, Rützler M, Robertson HM, Zwiebel LJ, 2007. Molecular characterization of the *Aedes aegypti* odorant receptor gene family. *Insect Mol. Biol.*, 16(5): 525–537.

Chang H, Liu Y, Yang T, Pelosi P, Dong S, Wang G, 2015. Pheromone binding proteins enhance the sensitivity of olfactory receptors to sex pheromones in *Chilo suppressalis*. *Sci. Rep.*, 5: 13093.

Chen X, Hu FL, 2009. Regulatory mechanism of pollen foraging behavior in honeybees. *Chin. Bull. Entomol.*, 46(3): 490–494. [陈璇，胡福良，2009. 蜜蜂花粉采集行为的调控机制. 昆虫知识，46(3): 490–494]

Claudianos C, Lim J, Young M, Yan S, Cristino AS, Newcomb RD, Gunasekaran N, Reinhard J, 2014. Odor memories regulate olfactory receptor expression in the sensory periphery. *Eur. J. Neurosci.*, 39(10): 1642–1654.

Dreller C, Tarpy DR, 2000. Perception of the pollen need by foragers in a honeybee colony. *Anim. Behav.*, 59(1): 91–96.

Dukas R, 2008. Mortality rates of honey bees in the wild. *Insect. Soc.*, 55(3): 252–255.

Engsontia P, Sanderson AP, Cobb M, Walden KK, Robertson HM,

Brown S, 2008. The red flour beetle's large nose: an expanded odorant receptor gene family in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(4): 387-397.

Fewell JH, Winston ML, 1992. Colony state and regulation of pollen foraging in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 30(6): 387-393.

Forstner M, Breer H, Krieger J, 2009. A receptor and binding protein interplay in the detection of a distinct pheromone component in the silkmoth *Antheraea polyphemus*. *Int. J. Biol. Sci.*, 5(7): 745-757.

Gao Q, Chess A, 1999. Identification of candidate *Drosophila* olfactory receptors from genomic DNA sequence. *Genomics*, 60(1): 31-39.

Graham JM, 2015. The Hive and the Honey Bee. Dadant & Sons, Inc., Hamilton, IL. 111-163.

Gu SH, Sun L, Yang RN, Wu KM, Guo YY, Li XC, Zhou JJ, Zhang YJ, 2014. Molecular characterization and differential expression of olfactory genes in the antennae of the black cutworm moth *Agrotis ipsilon*. *PLoS ONE*, 9(8): e103420.

Hill CA, Fox AN, Pitts RJ, Kent LB, Tan PL, Chrystal MA, Cravchik A, Collins FH, Robertson HM, Zwiebel LJ, 2002. G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science*, 298(5591): 176-178.

Hu YY, Xu SF, Abebe JW, Li W, Guo ZB, Zhou T, 2013. Research advance of olfactory proteins and olfactory mechanism in insects. *Genom. Appl. Biol.*, 32(5): 667-676. [胡颖颖, 徐书法, Abebe JW, 李薇, 国占宝, 周婷, 2013. 昆虫嗅觉相关蛋白及嗅觉识别机理研究概述. 基因组学与应用生物学, 32(5): 667-676]

Jones WD, Nguyen TA, Kloss B, Lee KJ, Vosshall LB, 2005. Functional conservation of an insect odorant receptor gene across 250 million years of evolution. *Curr. Biol.*, 15(4): R119-R121.

Karpe SD, Jain R, Brockmann A, Sowdhamini R, 2016. Identification of complete repertoire of *Apis florea* odorant receptors reveals complex orthologous relationships with *Apis mellifera*. *Genome Biol. Evol.*, 8(9): 2879-2895.

Kong CY, Wang GR, Liu Y, Yan SC, 2014. Gene cloning and expression analysis of three odorant receptors in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Sci. Agric. Sin.*, 47(9): 1735-1742. [孔畅仪, 王桂荣, 刘杨, 严善春, 2014. 小菜蛾三个普通气味受体基因的克隆及表达谱. 中国农业科学, 47(9): 1735-1742]

Krieger J, Klink O, Mohl C, Raming K, Breer H, 2003. A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.*, 189(7): 519-526.

Kuang BY, Kuang HO, 2002. Biology of the Honey Bee. Yunnan Science and Technology Press, Kunming. 101-105. [匡邦瑜, 匡海鸥, 2002. 蜜蜂生物学. 昆明: 云南科技出版社. 101-105]

Leal WS, 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 58(1): 373-391.

Liang QJ, Wang PC, Bai YR, 2012. Summarization on the progress in protein phosphorylation. *Sci. Technol. Rev.*, 30(31): 75-81. [梁前进, 王鹏程, 白燕荣, 2012. 蛋白质磷酸化修饰研究进展. 科技导报, 30(31): 75-81]

Liu NC, Zhang J, Wang GR, Liu Y, Yan SC, 2014. Cloning and tissue expression analysis of general odorant receptor genes *HarmOR9* and *HarmOR29* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin.*, 57(5): 522-529. [刘宁灿, 张进, 王桂荣, 刘杨, 严善春, 2014. 棉铃虫普通气味受体基因 *HarmOR9* 和 *HarmOR29* 的克隆和组织表达分析. 昆虫学报, 57(5): 522-529]

Liu Y, Gu SH, Zhang YJ, Guo YY, Wang GR, 2012. Candidate olfaction genes identified within the *Helicoverpa armigera* antennal transcriptome. *PLoS ONE*, 7(10): e48260.

Liu YP, Liu Y, Yang T, Gui FR, Wang GR, 2015. Identification and characterization of a general odorant receptor gene *PxylOR9* in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomol. Sin.*, 58(5): 507-515. [刘一鹏, 刘杨, 杨婷, 桂富荣, 王桂荣, 2015. 小菜蛾普通气味受体基因 *PxylOR9* 的鉴定及功能研究. 昆虫学报, 58(5): 507-515]

Münch D, Baker N, Kreibich CD, Bråten AT, Amdam GV, 2010. In the laboratory and during free-flight: old honey bees reveal learning and extinction deficits that mirror mammalian functional decline. *PLoS ONE*, 5(10): e13504.

Pankiw T, 2005. The honey bee foraging behavior syndrome: quantifying the response threshold model of division of labor. In: Proceedings IEEE 2005. Swarm Intelligence Symposium, I2005. SIS 2005. 1-6.

Park D, Jung JW, Choi BS, Jayakodi M, Lee J, Lim J, Yu Y, Choi YS, Lee MY, Park Y, Choi IY, Yang TJ, Edwards OR, Nah G, Kwon HW, 2015. Uncovering the novel characteristics of Asian honey bee, *Apis cerana*, by whole genome sequencing. *BMC Genomics*, 16(1): 1.

Robertson HM, Wanner KW, 2006. The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome Res.*, 16(11): 1395-1403.

Sánchez-Gracia A, Vieira FG, Rozas J, 2009. Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredity*, 103(3): 208-216.

Scheiner R, Amdam GV, 2009. Impaired tactile learning is related to social role in honeybees. *J. Exp. Biol.*, 212(7): 994-1002.

Smadja C, Shi P, Butlin RK, Robertson HM, 2009. Large gene family expansions and adaptive evolution for odorant and gustatory receptors in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Mol. Biol. Evol.*, 26(9): 2073-2086.

Wanner KW, Anderson AR, Trowell SC, Theilmann DA, Robertson HM, Newcomb RD, 2007a. Female-biased expression of odorant receptor genes in the adult antennae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 16(1): 107-119.

Wanner KW, Nichols AS, Walden KK, Brockmann A, Luetje CW, Robertson HM, 2007b. A honeybee odorant receptor for the queen substance 9-oxo-2-decenoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(36): 14383-14388.

Yang GH, 2009. The role of *Apis cerana cerana* in forest ecosystems of China. *Apicult. China*, 60(4): 5-7. [杨冠煌, 2009. 中华蜜蜂在我国森林生态系统中的作用. 中国蜂业, 60(4): 5-7]

Yang SS, 2015. Expression and Localization Analysis of Odorant Receptor Genes *AcerOr*1 and *AcerOrco* in the Chinese Honeybee, *Apis cerana cerana*. MSc Thesis, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi. [杨珊珊, 2015. 中华蜜蜂气味受体基因 *AcerOr*1 和 *AcerOrco* 的表达及定位研究. 山西太谷: 山西农业大学硕士学位论文]

Zhang ZX, Zhang MP, Wang GR, Liu Y, 2016. Cloning and characterization of an odorant receptor gene *AlucOR*40 in *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(6): 592-601. [张志翔, 张美萍, 王桂荣, 刘杨, 2016. 绿盲蝽气味受体基因 *AlucOR*40 的克隆及功能研究. 昆虫学报, 59(6): 592-601]

Zhao HT, 2013. Molecular Identification, Expression and Localization Analysis of Odorant Receptor Genes *Or*1, *Or*2 and *Or*3 from *Apis cerana cerana*. PhD Dissertation, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi. [赵慧婷, 2013. 中华蜜蜂气味受体基因 *Or*1、*Or*2 和 *Or*3 的鉴定、表达及定位分析. 山西太谷: 山西农业大学博士学位论文]

Zhao HT, Gao PF, Du HY, Ma WH, Tian SH, Jiang YS, 2014. Molecular characterization and differential expression of two duplicated odorant receptor genes, *AcerOr*1 and *AcerOr*3, in *Apis cerana cerana*. *J. Genet.*, 93(1): 53-61.

Zhao HT, Gao PF, Zhang GX, Tian SH, Yang SS, Meng J, Jiang YS, 2015. Expression and localization analysis of the odorant receptor gene *Orco* in drones antennae of *Apis cerana cerana*. *Sci. Agric. Sin.*, 48(4): 796-803. [赵慧婷, 高鹏飞, 张桂贤, 田嵩浩, 杨珊珊, 孟娇, 姜玉锁, 2015. 气味受体基因 *Orco* 在中华蜜蜂雄蜂触角中的表达及定位分析. 中国农业科学, 48(4): 796-803]

Zhao HT, Gao PF, Zhang GX, Zhang CX, Ma WH, Jiang YS, 2012. Gene cloning and sequence analysis of *Or*1 and *Or*2 in *Apis cerana*. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 49(5): 1117-1124. [赵慧婷, 高鹏飞, 张桂贤, 张春香, 马卫华, 姜玉锁, 2012. 东方蜜蜂气味受体基因 *Or*1 和 *Or*2 的克隆与序列分析. 应用昆虫学报, 49(5): 1117-1124]

Zhao HX, Zeng XN, Liang Q, Zhang XF, Huang WZ, Chen HS, Luo YX, 2015. Research on honeybee odorant-binding proteins biochemical characteristics, phyletic evolution, expression location and physiological function. *J. Environ. Entomol.*, 37(2): 420-425. [赵红霞, 曾鑫年, 梁勤, 张学锋, 黄文忠, 陈华生, 罗岳雄, 2015. 蜜蜂气味结合蛋白的生化特性、系统进化、表达部位和生理功能研究. 环境昆虫学报, 37(2): 420-425]

（责任编辑：马丽萍）